

REC'D 08 JUL 1998

WIPO

PCT



09/402569

**Bescheinigung**

**PRIORITY DOCUMENT**

Die Anmelderin Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung  
des öffentlichen Rechts in Heidelberg/Deutschland hat  
eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Protein zur Inhibierung von Apoptose"

am 1. April 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue  
Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patent-  
anmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die  
Symbole C 07 K, A 61 K und C 12 N der Internationalen  
Patentklassifikation erhalten.

München, den 17. April 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Zeichen: 197 13 434.3

Sieck

Anmelder: Deutsches Krebsforschungszentrum  
Stiftung des öffentlichen Rechts  
Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg

Unser Zeichen: K 2400 - hu / msl

### Protein zur Inhibierung von Apoptose

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Protein, das sich zur Inhibierung von Apoptose eignet, eine ein solches kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper.

Apoptose ist der programmierte Zelltod. Dieser wird z.B. vom Immunsystem dazu genutzt, schädliche Stoffe, wie Viren, abzuwehren. Hierzu greifen Virus-spezifische T-Lymphozyten jene Zellen des Körpers an, die Virus-infiziert sind und töten diese ab, indem sie Apoptose-induzierte Proteine, wie Perforin, freisetzen. Auch können die T-Lymphozyten den CD95 (APO-1/Fas)-Liganden exprimieren, wodurch der Zelltod über den CD95-Weg abläuft. Dieser Weg umfaßt die Bindung des CD95-Liganden an den CD95-Rezeptor, der dann mit dem Adapterprotein FADD interagiert, wodurch das "Recruitment" und die Aktivierung der Protease FLICE am DISC ("Death-Inducing Signaling Complex") induziert werden.

Weitere Arbeiten weisen darauf hin, daß Apoptose auch für die Ausbildung verschiedener Erkrankungen mit verantwortlich ist. Solche Erkrankungen sind z.B. AIDS, Autoimmunerkrankungen und neurodegenerative Erkrankungen. Um gegen diese Erkrankungen vorgehen zu können, wäre es hilfreich, Substanzen zu haben, die Apoptose inhibieren können. Solche Substanzen sind jedoch bisher nur unzureichend bekannt.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem Apoptose inhibiert werden kann.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Protein, das sich zur Inhibierung von Apoptose eignet, wobei das Protein die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz umfaßt.

10 Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis des Anmelders, daß in Tieren, besonders Säugetieren ganz besonders dem Menschen, ein Protein existiert, das Apoptose inhibieren kann. Dieses Protein umfaßt die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz. Ferner hat der Anmelder erkannt, daß das Protein mit dem Adapterprotein FADD interagiert, wodurch das "Recruitment" und die Aktivierung der Protease FLICE am DISC inhibiert werden.

15 In der vorliegenden Erfindung wird vorstehendes Protein mit FLIP ("FLICE-Inhibitory-Protein") bezeichnet.

20 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine für FLIP kodierende Nukleinsäure. Dies kann eine RNA oder eine DNA sein. Letztere kann z.B. eine genomische DNA oder eine cDNA sein. Bevorzugt ist eine DNA, die folgendes umfaßt:

- 25 (a) die DNA von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA,  
(b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA, oder  
(c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

30 Der Ausdruck "hybridisierende DNA" weist auf eine DNA hin, die unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der DNA, mit

einer DNA von (a) hybridisiert.

Die DNA von Fig. 1 wurde bei der DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) als C-FLIP/2/W23795 bzw. C-FLIP/1/AA115792 unter  
5 DSM 11488 bzw. DSM 11487 am 25. März 1997 hinterlegt.

Nachstehend wird eine erfindungsgemäße DNA in Form einer cDNA beschrieben. Diese steht beispielhaft für jede unter die vorliegende Erfindung fallende DNA.

10 Eine erfindungsgemäße cDNA kann durch übliche Verfahren hergestellt werden.

Günstig ist es von einer humanen Expressions-Bibliothek auszugehen und diese mit der DNA von Fig. 1, insbesondere mit Primern, die den 5'- bzw. 3'-Bereich der umrandeten DNA-Region betreffen, zu screenen. Als Hybridisierungs-Bedingungen können übliche, insbesondere vorstehend angegebene, gewählt werden.

15 Positive Klone können dann auf ihre Apoptose-Inhibierungsaktivität in üblichen Verfahren getestet werden.

Eine erfindungsgemäße cDNA kann in einem Vektor bzw. Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für E.coli sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDMB und pCEV4, anzugeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A.

25 Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um eine erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende cDNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E.coli-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM109, BL21 und SG 13009, den Hefe-Stamm Saccharomyces cerevisiae und die tierischen Zellen  
30 L, 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero und HeLa sowie die Insektenzellen sf9.

Der Fachmann weiß, in welcher Weise eine erfindungsgemäße cDNA in einen

Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese DNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden DNA inseriert werden kann, so daß die erfindungsgemäße cDNA in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden kann.

5

Des weiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. trans-fizierte Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße cDNA exprimierte Protein zu isolieren und zu reinigen. Ein solches Protein, das auch ein Fusionsprotein sein kann, ist somit ebenfalls  
10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehen-des Protein bzw. Fusionsprotein gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw.  
15 monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklona-len Antikörper, mit einem vorstehenden (Fusions)protein oder Fragment davon zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen (Fu-sions)protein oder Fragmenten davon erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann  
20 dann aus dem Serum bzw. Eigelb der Tiere erhalten werden. Für den monoklona-len Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht es, Apoptose und ihre Wirkung, insbeson-dere bei bestimmten Erkrankungen, wie AIDS, Autoimmunerkrankungen und neurodegenerativen Erkrankungen, im Detail zu untersuchen. Mit einer erfin-dungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer DNA, und hiervon abgeleiteten  
25 Primern, kann in Säugetieren, insbesondere dem Menschen, festgestellt werden, ob sie ein Gen enthalten und/oder exprimieren, das für ein FLIP-Protein im vorstehenden Sinne kodiert. Hierzu wird der Fachmann übliche Verfahren, wie  
30 Reverse Transkription, PCR-Reaktion, Hybridisierung und Sequenzierung, durch-führen. Erfindungsgemäß wird auch ein Kit bereitgestellt, der eine vorstehende Nukleinsäure, insbesondere DNA, und/oder hiervon abgeleitete Primer sowie

Träger und übliche Hilfsstoffe enthält.

5 Ferner eignet sich die vorliegende Erfindung, Apoptose zu inhibieren. Dies hat insbesondere bei Erkrankungen, wie AIDS und neurodegenerativen Erkrankungen, eine große Bedeutung. Ein erfindungsgemäßes FLIP-Protein kann in Säuge-  
tieren, insbesondere den Menschen, eingebracht werden. Hierzu kann es günstig  
sein, FLIP an ein vom jeweiligen Körper nicht als fremd angesehenes Protein,  
z.B. Transferrin oder BSA, zu koppeln. Auch kann eine erfindungsgemäße  
10 Nukleinsäure, insbesondere eine DNA, in Säugetieren, insbesondere den Men-  
schen, eingebracht und dort exprimiert werden. Hierzu kann es günstig sein, die  
Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäure unter die Kontrolle eines Gewe-  
be-spezifischen Promotors zu stellen. Vektoren, die für die Expression einer  
Nukleinsäure in Säugetieren geeignet sind, sind dem Fachmann bekannt. Des-  
weiteren kann mit einem erfindungsgemäßen Antikörper die Expression von FLIP  
15 kontrolliert und reguliert werden. Der Antikörper kann ferner in vorstehendem Kit  
vorliegen.

20 Die vorliegende Erfindung stellt somit einen großen Beitrag zur diagnostischen  
und therapeutischen Erfassung von apoptotischen Prozessen dar. Die diagnosti-  
sche Erfassung kann dabei nicht nur post- sondern bereits auch pränatal erfol-  
gen.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnung:

25 Fig. 1 zeigt die Basensequenz und die davon abgeleitete Aminosäurese-  
quenz, die von einem erfindungsgemäßen FLIP-Protein umfaßt ist.  
Die umrandete Sequenz gibt eine DED (Death Effector Domain)-  
Region wieder. Die Sequenz von Fig. 1 findet sich in DSM 11488.

30 Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

**Beispiel 1: Herstellung und Reinigung eines erfindungsgemäßen FLIP-Proteins**

Zur Herstellung eines erfindungsgemäßen FLIP-Proteins wird die DNA von Fig. 1 mit Bam HI-Linkern versehen, mit Bam HI nachgeschnitten und in den mit Bam HI gespaltenen Expressionsvektor pQE-8 (Diagen) inseriert. Es wird das Expressionsplasmid pQ/FLIP erhalten. Ein solches kodiert für ein Fusionsprotein aus 6 Histidin-Resten (N-Terminuspartner) und dem erfindungsgemäßen FLIP-Protein von Fig. 1 (C-Terminuspartner). pQ/FLIP wird zur Transformation von E.coli SG 13009 (vgl. Gottesmann, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265-273) verwendet. Die Bakterien werden in einem LB-Medium mit 10 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin kultiviert und 4 h mit 60 µM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid wird eine Lyse der Bakterien erreicht, anschließend wird mit dem Lysat eine Chromatographie (Ni-NTA-Resin) in Gegenwart von 8 M Harnstoff entsprechend der Angaben des Herstellers (Diagen) des Chromatographie-Materials durchgeführt. Das gebundene Fusionsprotein wird in einem Puffer mit pH 3,5 eluiert. Nach seiner Neutralisierung wird das Fusionsprotein einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. Thomas, J.O. und Kornberg, R.D., J.Mol.Biol. 149 (1975), 709-733).

Es zeigt sich, daß ein erfindungsgemäßes (Fusions)protein in hochreiner Form hergestellt werden kann.

**Beispiel 2: Herstellung und Nachweis eines erfindungsgemäßen Antikörpers**

Ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beipiel 1 wird einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung des Gels mit 4 M Natriumacetat wird eine ca. 20-60 kD Bande aus dem Gel herausgeschnitten und in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung inkubiert. Gel-Stücke werden sedimentiert, bevor die Proteinkonzentration des Überstandes durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, der eine Coomassie-Blau-Färbung folgt, bestimmt wird. Mit dem Gel-gereinigten Fusionsproteine werden Tiere wie folgt

immunisiert:

### Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen

- 5 Pro Immunisierung werden 35  $\mu\text{g}$  Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,7 ml PBS und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

Tag 0:	1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 14:	2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
10 Tag 28:	3. Immunisierung (icFA)
Tag 56:	4. Immunisierung (icFA)
Tag 80:	Ausbluten

- 15 Das Serum des Kaninchens wird im Immunoblot getestet. Hierzu wird ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (vgl. Khyse-Andersen), J., J.Biochem.Biophys. Meth. 10, (1984), 203-209). Die Western Blot-Analyse wird wie in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215-229, beschrieben, durchgeführt. Hierzu wird das Nitrocellulosefilter 1 h bei 37°C mit
- 20 einem ersten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist das Serum des Kaninchens (1:10000 in PBS). Nach mehreren Waschschritten mit PBS wird das Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) (1:5000) in PBS. Nach 30-minütiger Inkubation bei
- 25 37°C folgen mehrere Waschschrritte mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung (36  $\mu\text{M}$  5' Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, 400  $\mu\text{M}$  Nitroblau-tetrazolium, 100 mM Tris-HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) bei Raumtemperatur, bis Banden sichtbar werden.
- 30 Es zeigt sich, daß erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper hergestellt werden können.



### **Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn**

Pro Immunisierung werden 40  $\mu$ g Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,8 ml PBS und 0,8 ml kompletten bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

5

- Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)  
Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)  
Tag 50: 3. Immunisierung (icFA).

10

Aus Eigelb werden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es werden erfindungsgemäße polyklonale Antikörper nachgewiesen.

### **Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus**

15

Pro Immunisierung werden 12  $\mu$ g Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,25 ml PBS und 0,25 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt; bei der 4. Immunisierung ist das Fusionsprotein in 0,5 ml (ohne Adjuvans) gelöst.

20

- Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)  
Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)  
Tag 56: 3. Immunisierung (icFA)  
Tag 84: 4. Immunisierung (PBS)  
Tag 87: Fusion

25

Überstände von Hybridomen werden im Western Blot getestet. Erfindungsgemäße, monoklonale Antikörper werden nachgewiesen.

Anmelder: Deutsches Krebsforschungszentrum  
"Protein zur Inhibierung von Apoptose"  
Unser Zeichen: K 2400 - hu / msl

### Patentansprüche

1. Protein, geeignet zur Inhibierung von Apoptose, wobei das Protein die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz umfaßt.
2. DNA, kodierend für das Protein nach Anspruch 1, wobei die DNA umfaßt:
  - (a) die DNA von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA,
  - (b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA oder
  - (c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.
3. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach Anspruch 2.
4. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 3.
5. Verfahren zur Herstellung des Proteins nach Anspruch 1, umfassend die Kultivierung der Transformante nach Anspruch 4 unter geeigneten Bedingungen.
6. Antikörper, gerichtet gegen das Protein nach Anspruch 1.
7. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 als Reagens zur Inhibierung von Apoptose.
8. Verwendung der DNA nach Anspruch 2 als Reagens zur Diagnose und/oder Inhibierung von Apoptose.

1. April 1997

- 2 -

9. Verwendung nach Anspruch 7 oder 8, wobei die Apoptose-Inhibierung bei AIDS oder neurodegenerativen Erkrankungen erfolgt.

Anmelder: Deutsches Krebsforschungszentrum  
Unser Zeichen: K 2400 - hu / msl

## **Zusammenfassung**

### **Protein zur Inhibierung von Apoptose**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Protein, das sich zur Inhibierung von Apoptose eignet, eine ein solches kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper.

AGAGTAGATGTCCTGAAGTCATCCATCAGGTGAAGAAGCAGCTGAACAGATGAGAAGAGATGCT  
 70  
 K S R M S A E V I H Q V E E A L D I D E K E M L  
 GCCTCTTTTGTCGCCGGAGTGTCTATAGATGTGGTTCACCTAATGTGAGGACCTCTGATATTTA  
 140  
 L F L C R D V A I D V V P P N V R D L L D I L  
 CGGAAAGAGGTAAGCTGTCTGTCTGGGACTTGGCTGAACCTGCTCTACAGAGTGAGGCGATTGACCTGC  
 210  
 R E R G K L S V G D L A E L L Y R V R R F D L  
 TCAACGTAATCTGAAGATGACAGAAAAGCTGTGGAGACCCACCTGCTCAGGAACCTCACCCTGTTTC  
 280  
 L K R I L K M D R K A V E T H L L R N P H L V S  
 GGACTAATAGAGTGTGATGTCAGAGATTGGTGA  
 313  
 D Y R V L M S E I G E

☐ DHD

Fig. 1

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

---